

中华蜜蜂信息素结合蛋白 ASP1 cDNA 的克隆及时空表达

李红亮^{1,2}, 高其康^{2,*}, 程家安²

(1. 中国计量学院生命科学学院 杭州 310018; 2. 浙江大学昆虫科学研究所 杭州 310029)

摘要: 信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBP)在昆虫信息素的识别、传递和处理过程中具有重要作用。本研究首次克隆了中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的一个 PBP 基因 *Ac-ASP1* (GenBank 序列号为 DQ449670), 其预测蛋白具有典型的气味结合蛋白(OBPs)标志(即成熟肽含有 6 个保守的半胱氨酸)。利用 real-time PCR 技术对 *Ac-ASP1* 在中蜂不同组织和发育历期的时空表达谱进行了鉴定。绝对定量结果显示 *Ac-ASP1* 高丰度地表达于工蜂触角(2.07×10^6 拷贝数/ μg), 而在其他组织(如头、胸、腹、翅及足)中呈低丰度表达(10^2 拷贝数/ μg); 相对定量结果显示 *Ac-ASP1* 在各发育历期如幼虫、蛹以及成虫发育早期 1~6 日龄均有大量表达, 而在 21 日龄前后具有另外一个高丰度表达时期。这些结果可为明确 *Ac-ASP1* 在中蜂蜂王信息素信号识别传递过程中的作用提供参考。

关键词: 中华蜜蜂; 工蜂; 信息素结合蛋白; 克隆; 时空表达; 实时定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)07-0689-05

Cloning and spatio-temporal expression of cDNA encoding pheromone binding protein ASP1 in *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

LI Hong-Liang^{1,2}, GAO Qi-Kang², CHENG Jia-An² (1. College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Pheromone binding proteins (PBPs) play an important role in recognition, transmission and processing of insect pheromones. In this study, a cDNA named *Ac-ASP1* encoding a PBP was cloned (from the Chinese native honeybee, *Apis cerana cerana*). The predicted protein has six conservative cysteines in mature peptide, a typical symbol of odorant binding proteins (OBPs). The sequence had been submitted into GenBank and registered is the accession no. DQ449670. The profile of spatio-temporal expression of *Ac-ASP1* was identified by real-time PCR. The results of absolute quantitation showed that *Ac-ASP1* was expressed at a higher level in antenna (2.07×10^6 copy number/ μg), but at a less level in other tissues including head, thorax, abdomen, wings and legs (10^2 copy number/ μg); while the results of relative quantitation revealed that *Ac-ASP1* was expressed in two high abundance periods: from larva to the 6th day of adult and around the 21st day of adult. These results may provide the reference to ascertain the function of *Ac-ASP1* involved in signal recognition and transmission of queen pheromone.

Key words: *Apis cerana cerana*; worker bee; pheromone binding proteins (PBPs); cloning; spatio-temporal expression; real-time PCR

昆虫嗅觉感器内部的胞外空间淋巴液中存在着一一种球状、小分子量的水溶性蛋白, 其作用是结合并运送疏水性的气味分子通过水性的淋巴液到达嗅觉神经树突末梢, 称之为气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs) (Pelosi and Maida, 1995)。根据配基

不同通常将昆虫 OBPs 分为信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)和普通气味结合蛋白(general odorant binding proteins, GOBPs) (Vogt et al., 1991), 其中 PBPs 主要参与昆虫性信息素的识别, 而 GOBPs 主要参与其他气味物质的识别, 在昆

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270896); 浙江省自然科学基金项目(Y307597)

作者简介: 李红亮, 男, 1981 年 1 月生, 河南新乡人, 博士, 讲师, 研究方向为昆虫分子生物学与外来生物入侵, E-mail: hlli@cjl. edu. cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: qkgao@zju. edu. cn

收稿日期 Received: 2008-02-22; 接受日期 Accepted: 2008-05-12

虫化学感受行为中嗅觉神经元在对特定化学信号识别过程中二者都是必需的(Kim *et al.* , 1998)。

蜜蜂作为一种典型的社会性昆虫,其整个蜂巢是由一头蜂王、少量雄蜂和多头工蜂所组成的严密的社会组织体系,其中蜂王释放的蜂王信息素是维系整个蜂巢稳定的重要信息素。Danty 等(1998)首先在意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L. , 简称意蜂) 中发现并确定了一类触角特异蛋白(antenna special proteins , ASPs) , 其中 ASP1 是首次在社会性昆虫中发现的与巢穴组织相关的信息素结合蛋白, 它可与蜂王信息素的主要成分相结合, 并与发现的另外一种气味结合蛋白 ASP2 相拮抗(Danty *et al.* , 1999)。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius(简称中蜂) 是中国优良的土著蜂种, 其嗅觉灵敏, 具有较强的抗寒、抗螨等抗逆性, 特别对于依赖中蜂授粉的分散零星植物, 以及早春、晚秋较低温度下开花的植物都具有重要作用。但是由于意蜂等外来蜂种的引入, 使得近年来中蜂的种群数量和分布范围急剧下降, 甚至在某些地区已经到了灭绝的边缘(季荣等, 2003)。意蜂对中蜂的威胁重要原因之一在于二者的蜂王信息素主要成分相同, 所以在中蜂婚飞交配过程中, 易受意蜂雄蜂干扰从而使中蜂蜂王的交配成功率大幅下降(杨冠煌, 2005)。因此, 为了更好地保护和利用中蜂这一我国特有的种质资源, 深入了解中蜂蜂王信息素的传递和作用过程, 我们需要对中蜂独特的生理功能分子机制进行深入研究。

PBPs 作为信息素结合的受体蛋白, 与蜜蜂工蜂对蜂王信息素分子的识别、传递和处理过程具有直接的联系。但目前国内外对于中蜂的信息素结合蛋白研究情况尚无报道。我们根据已知的意蜂 ASP1 基因为基础设计引物, 利用 RT-PCR 技术扩增并首次克隆了中蜂信息素结合蛋白 ASP1 基因(*Ac-ASP1*) , 并在此基础上利用 real-time PCR 技术对 *Ac-ASP1* 在中蜂不同部位和发育历期的时空表达谱进行了综合鉴定和分析, 对研究 ASP1 基因在中蜂信息素识别信号传递过程中的作用提供了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 供试昆虫

中蜂工蜂取自浙江大学蜂场, 按 1、4、6、9、12、15、18、21、24、27、30 等 11 个不同日龄的中蜂分批进行捕捉, 每批 50 头, 完整地切下其触角于 1.5 mL 离

心管中, 立即投入液氮保存备用。

1.2 质粒及菌种

pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司, 大肠杆菌 *Escherichia coli* TG1 为本室保存。主要试剂及工具酶: 总 RNA 提取试剂盒 TRIzol、SuperScript™ II 反转录酶购自 Invitrogen 公司, RNeasy Mini Kits 购自 Qiagen 公司, Super SYBR Green 染料及 DNA marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司, X-gal、IPTG、氨苄青霉素等购自上海生工公司, 其他均为国产或进口分析纯试剂。

1.3 不同日龄中蜂触角总 RNA 的提取及 cDNA 合成

分别取 13 个日龄中蜂触角各 50 对, 用液氮研磨后, 参照 TRIzol 试剂盒说明书的步骤提取总 RNA。以 SuperScript™ II 反转录酶合成 cDNA 第一链。

1.4 中蜂 ASP1 引物设计

根据 GenBank 中意蜂 ASP1 序列(AF166496 和 AF393494) 开放阅读框序列, 设计引物 ASP1, 上游引物为 5'-ATGGYTAGCAACACGAAGCA-3', 下游引物为 5'-AAGCTTTTAGATAACGAACC-3', 用来克隆中蜂 ASP1 cDNA 全长, 目的条带长度为 435 bp。

1.5 中蜂 ASP1 cDNA 的扩增、克隆和测序

以反转录酶合成 cDNA 第一链为模板, 用 ASP1 引物对其进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 45 s, 53℃ 45 s, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳并割胶纯化, 克隆于 pGEM-T Easy 载体内, 并送至浙江大学分析测试中心进行测序, 并对序列结果进行生物信息学分析及 GenBank 登录。

1.6 质粒标准品制备

将 1.5 中阳性克隆接种于 LB 培养基中(含氨苄青霉素 50 mg/mL) , 37℃ 过夜培养, 碱法提取该阳性克隆质粒, 紫外分光光度法对质粒进行定量, 并根据质粒长度计算得出单位质量质粒所含目的基因拷贝数, 并倍比稀释 7 个浓度梯度。

1.7 定量 PCR 引物设计

根据 1.5 中测序结果设计一对特异性引物 FQA1, 上游引物为 5'-CGCCTCTAACAAGCAATACA-3', 下游引物为 5'-GTTCCGTCGTCCTCCTCT-3', 目的条带长度为 209 bp, 用来进行绝对定量分析; 根据 GenBank 中意蜂 β -actin 序列(XM_623378, XM_393368) 设计引物 BeAc, 上游引物为 5'-TCCTGCTATGTATG TCGC-3', 下游引物为 5'-AGTTGCCATTTCTCTGTTTC-3', 目的条带长度为 301 bp,

用来进行相对定量分析。

1.8 定量 PCR 检测 ASP1 时空表达

利用 1.7 中设计的引物及 1.6 中制备的 ASP1 质粒标准品,以 1.3 中提取的 13 个日龄的中蜂触角 cDNA 为模板,于 iCycler iQ™ real-time PCR 检测系统 (Bio-Rad) 上进行操作,每一样品重复 3 次(计算标准差)。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 3 min,94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 40 s,45 个循环,72℃ 5 min;最后以每 10 s 上升 0.5℃ 的速度从 53℃ 到 95℃ 记录熔解曲线,荧光波长为 FAM 490 nm。

1.9 数据分析

分别利用标准曲线推算出各样品的原始拷贝数,并根据各样品对应的 β -actin 所得的 Ct 值,作为阳性对照利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法 (Livak and Schmittgen, 2001) 对各样品进行校正,最终得到 ASP1 在中蜂工蜂各

部位和不同发育历期的表达谱。

2 结果与分析

2.1 Ac-ASP1 cDNA 的扩增、克隆与酶切鉴定

以反转录的 cDNA 第一链为模板,以 ASP1 引物进行 PCR 扩增,扩增产物长度约 435 bp,与预期大小基本一致。序列测定结果表明,Ac-ASP1 序列读码框全长 435 bp,编码 144 个氨基酸残基(包括 N 端 19 个氨基酸的信号肽),预测其分子量约为 16.0 kD,等电点约为 3.92,且成熟肽中含有 6 个保守的半胱氨酸位点——为昆虫气味结合蛋白的典型标志(图 1)。经 BlastX 分析显示,其与意蜂 ASP1 基因具有 88.9% 的相似性,表明同源性较高。该序列已在 GenBank 中登录,序列号为 DQ449670。

ATGGTTAGCAACACGAAGCAATCCTTCATCTGTTCCGTCGTCTCTCTGCCTCGAGACGATTTTCGTGAACGCAGCGCCGGATTGG
M V S N T K Q S F I C S V V L L C L E T I F V N A A P D W
GTGCCGCCGAGGTGTTTCGACATGGTCGCGGAGGACAAGGCTCGTTGCATGGCGGAGCACGGAACGACGCAAGCGCAAAATCGACGAG
V P P E V F D M V A E D K A R [C] M G E H G T T Q A Q I D E
GTGGACAAAGGGAACCTGGTAAACGAACCGTCCATCACTTGCTACATGTATTGCTTGTAGAGCGGTTTCAGCTTGGTGGACGATGAG
V D K G N L V N E P S I T [C] Y M Y [C] L L E A F S L V D D E
GCAAACGTGGACGTGGATATGATGTTGGGCCTGTTGCCGGATCATCTTCAAGAAAGGGCTGAGTCGATCATGGGCAAATGCCTTCCA
A N V D V D M M L G L L P D H L Q E R A E S I M G K [C] L P
ACCTCCGGCTCCGACAATTGCGACAAGATGTACAATCTCGCCAAATGCGTCCAAGAATCTGCACCGGACGTATGTTTCGTTATCTAA
T S G S D N [C] D K M Y N L A K [C] V Q E S A P D V W F V I *

图 1 Ac-ASP1 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of Ac-ASP1 gene
方框标记为保守的半胱氨酸 Conservative Cys labeled by panes; 单下划线为预测的信号肽序列,双下划线为终止密码子。
The predicted signal peptide sequence is labeled by single underline, while terminate codon is labeled by double underline.

2.2 基于 real-time PCR 的 Ac-ASP1 时空表达鉴定

根据设计的 β -actin 引物和 pFQA1 引物,利用 1.3 得到的 13 个中蜂日龄触角 cDNA 为模板,首先采用比较 Ct 值的相对定量方法对 Ac-ASP1 的转录水平的时空表达进行定量,反应中同时加入阴性对照(染料 + ddH₂O + pFQA1 引物)和空白对照(染料 + ddH₂O)。熔解曲线(图 2)中所示 β -actin 和 ASP1 的两个独立峰,表明扩增产物单一,阴性对照显示为引物二聚体,空白对照无任何扩增产物。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法,以 β -actin 为参照,计算出 Ac-ASP1 在不同发育历期的转录表达情况,如图 3 所示,Ac-ASP1 在各发育历期中,如幼虫、蛹以及成虫发育早期(1~6 日龄)均有大量表达,而在 21 日龄前后具有另外一个高丰度表达时期,而在这两个表达高峰之间(9~15

日龄左右)则表达丰度相对较低。

由于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法的相对定量算法不适于不同组织表达的研究,我们又采用具有标准曲线的绝对定量方法对 Ac-ASP1 的空间表达进行精确定量。如图 4、5 所示,Ac-ASP1 除了在触角内呈高丰度表达外(2.07×10^6 拷贝数/ μ g),其他部分表达量仅呈 10^2 拷贝数/ μ g 数量级表达。从而得到中蜂 Ac-ASP1 的精确拷贝数,并证明其在除触角以外的其他组织中确实表达,只是丰度远远比触角中低(相差 10^4 数量级)。

3 讨论

通过 RT-PCR 技术我们首次得到了中蜂的一个

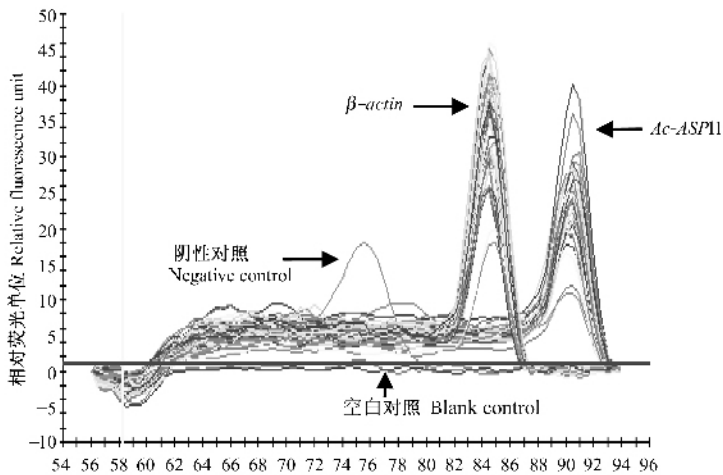


图 2 *Ac-ASP1* 溶解曲线 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)

Fig. 2 Melt curve graph of real-time PCR of *Ac-ASP1* (method of $2^{-\Delta\Delta C_t}$)

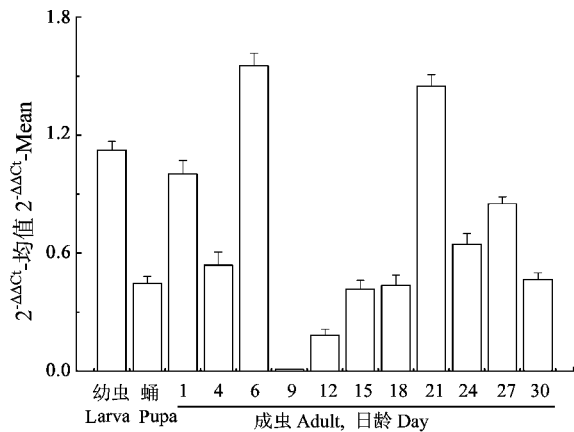


图 3 *Ac-ASP1* 在不同发育历期的表达情况 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)

Fig. 3 Transcription profiles in developmental phases of *Ac-ASP1* (method of $2^{-\Delta\Delta C_t}$)

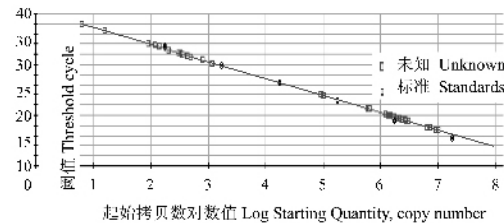


图 4 *Ac-ASP1* 标准曲线 (绝对定量法)

Fig. 4 Standard curve of real-time PCR of *Ac-ASP1* (method of absolute quantitation)

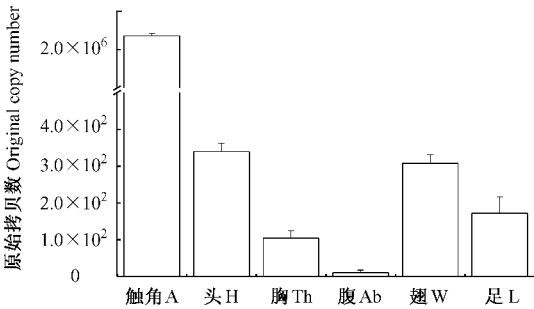


图 5 *Ac-ASP1* 在不同组织的表达情况 (绝对定量法)

Fig. 5 Transcription profiles in tissues of *Ac-ASP1* (method of absolute quantitation)

A : Antenna ; H : Head ; Th : Thorax ; Ab : Abdomen ; W : Wing ; L : Leg.

信息素结合蛋白 cDNA-*Ac-ASP1*, 该基因具有典型的气味结合蛋白特征 (成熟肽包含 6 个保守的半胱氨酸, 图 1)。通过 real-time PCR 技术对蜂王 *ASP1* 时空表达谱情况进行了研究, 发现其高丰度地表达于工蜂触角 (2.07×10^6 拷贝数/ μg), 而在其他器官 (如头、胸、腹、翅及足) 中呈低丰度表达 (10^2 拷贝数/

μg)。这与蜜蜂 *ASP1* 的表达情况类似。从不同发育历期的时间表达谱上来看, *Ac-ASP1* 在各发育历期如幼虫、蛹以及成虫发育早期 (1~6 日龄) 均有大量表达, 而在 21 日龄前后具有另外一个高丰度表达时期, 而在这两个表达高峰之间 (9~15 日龄左右) 则表达丰度相对较低。由于在这两个时期中蜂王分别处于内勤蜂 (哺育幼蜂和蜂王、酿蜜和清洁巢房) 以及采集蜂 (外出采蜜粉) 时期, 均是在其职能最为繁重的时期, 故 *Ac-ASP1* 应该在这两个频繁旺盛的活动中发挥了重要的作用。

其他昆虫中最初认为 PBP 为雄虫特异表达 (Vogt and Riddiford, 1981), 但后来发现 PBP 不仅仅存在于雄虫中, 在许多种昆虫的雌虫中都发现 PBP 的存在, 如蟑螂 *Leucophaea maderae* 的 PBP 仅表达于雌虫的触角中, 而其性信息素的产生实际上是雄虫产生的 (Riviere et al., 2003); 而在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 雌虫中也发现两个 PBP 的表达量

分别占到雄虫的 39% 和 73%(Xiu and Dong , 2007); 另外在烟草天蛾 *Manduca sexta* 中 ,雌雄虫触角中 PBP_s 的表达基本没有区别 ,这似乎与性别完全没有相关性(Györgyi *et al.* , 1988)。这种 PBP_s 的性不相关性作用不详 ,可能雌虫触角中表达的 PBP_s 起到一个监视信息素释放的功能(Callahan *et al.* , 2000)。对于中蜂而言 ,作为社会性昆虫 ,其 PBP_s 不同表达量所体现的意义与鳞翅目昆虫等两性昆虫还存在较大差异 ,故还要作进一步的研究。

另外 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法的相对定量算法不适于不同组织表达的研究 ,原因在于 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法主要是以 β -*actin* 的扩增作为阳性参照 ,假如在 PCR 模板中目的基因的拷贝数极低而 β -*actin* 的拷贝数相对较高 ,则利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算得到的结果就可能出现因 β -*actin* 丰度过高而掩盖了目的基因表达 ,导致出现假阴性的结果(Livak and Schmittgen , 2001)。而利用绝对定量我们从已知浓度的质粒标准品作出的标准曲线 ,精确计算出了 ASP1 在中蜂不同组织中的原始拷贝数。Calvello 等(2005)曾在意蜂研究中 ,通过半定量的方法判定 ASP1 均大量表达于工蜂、雄蜂和蜂王的触角 ,在雄蜂和工蜂的足内有少量表达。由于半定量对于目的基因的起始浓度不能准确定量 ,所以我们采用带标准曲线的绝对定量法 ,发现 ASP1 仅在中蜂触角内呈 10^6 拷贝数/ μg 数量级的高丰度表达 ,远高于在其他组织中表达量(10^2 数量级)。

参 考 文 献 (References)

Callahan FE , Vogt RG , Tucker ML , Dickens JC , Mattoo AK , 2000. High level expression of " male specific " pheromone binding proteins (PBP_s) in the antennae of female noctuid moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 30 : 507 – 514.

Calvello M , Brandazza A , Navarrini A , Dani FR , Turillazzi S , Felicioli A , Pelosi P , 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* , 35 : 297 – 307.

Danty E , Arnold G , Huet JC , Huet D , Masson C , Pernollet JC , 1998. Separation , characterization and sexual heterogeneity of multiple putative

odorant-binding proteins in the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae). *Chem. Senses* , 23 : 83 – 91.

Danty E , Briand L , Michard-Vanhée C , Perez V , Arnold G , Gaudemer O , Huet D , Huet JC , Ouali C , Masson C , Pernollet JC , 1999. Cloning and expression of a queen pheromone-binding protein in the honeybee : an olfactory-specific , developmentally regulated protein. *J. Neurosci.* , 19 : 7 468 – 7 475.

Györgyi TK , Roby-Shemkovitz AJ , Lerner MR , 1988. Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm , *Manduca sexta* : a tissue-specific developmentally regulated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 85 : 9 851 – 9 855.

Ji R , Xie BY , Yang GH , Li DM , 2003. From introduced species to invasive – a case study on the Italian bee *Apis mellifera* L. *Chinese Journal of Ecology* , 22 : 70 – 73. [季荣 , 谢宝瑜 , 杨冠煌 , 李典谟 , 2003. 从有意引入到外来入侵——以意大利蜂 *Apis mellifera* L. 为例. 生态学报 , 22 : 70 – 73]

Kim MS , Repp A , Smith DP , 1998. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* , 150 : 711 – 721.

Livak KJ , Schmittgen TD , 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (T) Method. *Methods* , 25 : 402 – 408.

Pelosi P , Maida R , 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* , 111 : 503 – 514.

Riviere S , Lartigue A , Quennedey B , Campanacci V , Farine JP , Tegoni M , Cambillau C , Brossut R , 2003. A pheromone-binding protein from the cockroach *Leucophaea maderae* : cloning , expression and pheromone binding. *Biochem. J.* , 371 : 573 – 579.

Vogt RG , Riddiford LM , 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* , 293 : 161 – 163.

Vogt RG , Prestwich GD , Lerner MR , 1991. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol.* , 22 : 74 – 84.

Xiu WM , Dong SL , 2007. Molecular characterization of two pheromone binding proteins and quantitative analysis of their expression in the beet armyworm , *Spodoptera exigua* Hübner. *J. Chem. Ecol.* , 33 : 947 – 961.

Yang GH , 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica* , 48 : 401 – 406. [杨冠煌 , 2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. 昆虫学报 , 48 : 401 – 406]

(责任编辑 : 赵利辉)